

Sonderabdruck aus „Zeitschrift für analytische Chemie“ Bd. 97. Heft 7 u. 8.  
Verlag von J. F. Bergmann in München.

---

## **Die nephelometrische Bestimmung der Eiweißfraktionen des Blutplasmas mit Hilfe des Stufenphotometers von Zeiss.**

Von

**Dr. A. Korányi und Dr. E. B. Hatz.**

Aus der Medizinischen Klinik der königl. ungarischen Franz-Joseph-Universität in Szeged. Vorstand: Prof. Dr. Stefan Ruzsnyák.

[Eingegangen am 3. April 1934.]

Während die Änderungen der chemischen Zusammensetzung des Blutplasmas unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Umständen infolge der immer zahlreicheren Mikromethoden rasch bekannt geworden sind, wurden die Verhältnisse des Plasmaeiweißes bis zum letzten Jahrzehnt verhältnismäßig nur wenig aufgeklärt. Der Grund hierfür ist zweifellos nicht in der Unwichtigkeit der quantitativen Verhältnisse der Eiweißfraktionen zu suchen, sondern in der Unzuverlässigkeit und Schwerfälligkeit der bisher verwendeten Bestimmungsmethoden.

Das gravimetrische Verfahren von O. Hammarsten<sup>2)</sup> und das colorimetrische Verfahren von Autenrieth<sup>3)</sup> waren aus denselben Gründen für weitläufige Untersuchungen nicht geeignet. Ein bedeutender Fortschritt war wegen ihrer Genauigkeit die auf Stickstoffbestimmungen beruhende Methode von P. E. Howe<sup>4)</sup>. Obwohl diese Methode ihrer Zuverlässigkeit wegen allgemein anerkannt wurde, war sie für klinische und experimentelle Reihenuntersuchungen doch noch immer viel zu umständlich. Die Untersuchungen von P. A. Kober<sup>5)</sup>, W. R. Bloor<sup>6)</sup> und H. Kleinmann bewiesen zwar die Einfachheit und vielseitige Verwendbarkeit der nephelometrischen Verfahren, die Aufmerksamkeit

<sup>2)</sup> Hoppe-Seylers Chem. Analyse, S. 649 (1909).

<sup>3)</sup> Münch. med. Wochenschrft. **62**, 42 (1915) u. **64**, 8 (1917).

<sup>4)</sup> Journ. of Biol. Chem. **49**, 109 (1921); vergl. diese Ztschrft. **63**, 76 (1923).

<sup>5)</sup> Journ. of Biol. Chem. **13**, 485 (1912/13).

<sup>6)</sup> Journ. Americ. Chem. Soc. **36**, 1300 (1914); vergl. diese Ztschrft. **58** 520 (1919); Journ. of Biol. Chem. **17**, 377 (1914).

wendete sich jedoch erst viel später auf die nephelometrische Bestimmung der ausgefällten Eiweißtrübungen des Blutplasmas. Zwei französische Verfasser, H. Bénard und A. Laborde<sup>1)</sup>, verwendeten zwar die nephelometrische Methode bei ihren Untersuchungen, ihr Verfahren wurde jedoch nicht ausführlich veröffentlicht. St. Rusznyák<sup>2)</sup> veröffentlichte als erster eine Methode, mit deren Hilfe er zuerst den Albumin-Globulinquotienten, später auch das Fibrinogen und die Globuline bestimmen konnte. Er benutzte als Nephelometer das nach seinen Plänen umgewandelte Chromophotometer von J. Plesch<sup>3)</sup> und fand in seinen Reihenuntersuchungen zur Fällung des Eiweißes verschieden konzentrierte Ammoniumsulfatlösungen am geeignetsten. Mittels seiner Mikromethode lassen sich die Eiweißfraktionen des Plasmas rasch und recht genau bestimmen. Auf gravimetrischem Weg kontrollierte Ergebnisse zeigten gut übereinstimmende Resultate.

Die Methode von Rusznyák wurde trotz dieser experimentell gefundenen Übereinstimmung der Werte von P. Rona und H. Kleinmann<sup>4)</sup> in Frage gestellt, weil sie annahmen, daß die von den Salzlösungen verursachten Eiweißniederschläge eine Tendenz zur Flockenbildung hätten, wodurch schon nach kurzer Zeit am Nephelometer nicht mehr die ursprünglichen Werte abzulesen seien. Rusznyák<sup>5)</sup> weist demgegenüber in einer späteren Arbeit die Verlässlichkeit seiner Methode nach, indem er experimentell dartut, daß die Größe der Eiweißtrübungen sogar nach einer Stunde noch keine meßbare Änderung aufweist. Wir unternahmen ebenfalls diesbezügliche Untersuchungen und fanden, daß die Trübungsgrade binnen 30 Minuten nur belanglose Differenzen ergeben. Wie sehr die Methode von Rusznyák für diagnostische und klinische Untersuchungen geeignet ist, beweist am besten ihre Verbreitung. F. L. Oudendal<sup>6)</sup>, der die Prognose der Tuberkulose auf Blutplasmauntersuchungen begründet, verwendet die Rusznyáksche Methode bei der Bestimmung des Albumin-Globulin-Quotienten geradezu als Kontrollmethode. Kürzlich brachte G. A. Rademaker<sup>7)</sup> in einer beachtenswerten und gründlichen Abhandlung über nephelometrische Untersuchungen des Serums die Bestätigung der Brauchbarkeit der Methode Rusznyáks.

In unseren Untersuchungen erstrebten wir:

#### 1. Die mit Hilfe des Rusznyákschen nephelometrischen Verfahrens

<sup>1)</sup> Compt. rend. 176, 98 (1923).

<sup>2)</sup> Biochem. Ztschrft. 133, 370 (1922); vergl. diese Ztschrft. 80, 124 (1930).

<sup>3)</sup> Biochem. Ztschrft. 141, 479 (1923); vergl. diese Ztschrft. 80, 124 (1930).

<sup>4)</sup> Biochem. Ztschrft. 140, 461 (1923); vergl. diese Ztschrft. 79, 58 (1930).

<sup>5)</sup> Biochem. Ztschrft. 144, 147 (1923).

<sup>6)</sup> Ellermann, Harms et Co. Amsterdam.

<sup>7)</sup> Kemink en Zoon, Utrecht 1933.

gewonnenen Eiweißfraktionswerte mit den Ergebnissen der auf Stickstoffbestimmungen beruhender Methode Howes zu vergleichen.

2. Die Anwendung des Stufenphotometers von Zeiss als Nephelometer.

3. Für klinische und experimentelle Reihenbestimmungen der Eiweißfraktionen ein einfaches, rasches und verlässliches Verfahren auszuarbeiten.

Unser unten im einzelnen beschriebenes Verfahren beruht darauf, daß wir Citratplasma nach dem Rusznyákschen Prinzip mit verschiedenen konz. Ammonsulfatlösungen versetzten, so daß 1. das Gesamteiweiß, 2. Globulin mit Fibrinogen zusammen und 3. nur Fibrinogen ausgeschieden wurde. Die auftretenden Trübungen bestimmten wir nephelometrisch. Daneben führten wir aus denselben Plasmalösungen die Bestimmung der einzelnen Eiweißfraktionen nach Howe aus. Auf Grund dieser beiden Bestimmungen konstruierten wir eine Kurve (Abb. 30), aus der sich dann aus den Trübungen die Menge der einzelnen Eiweißfraktionen entnehmen ließ.

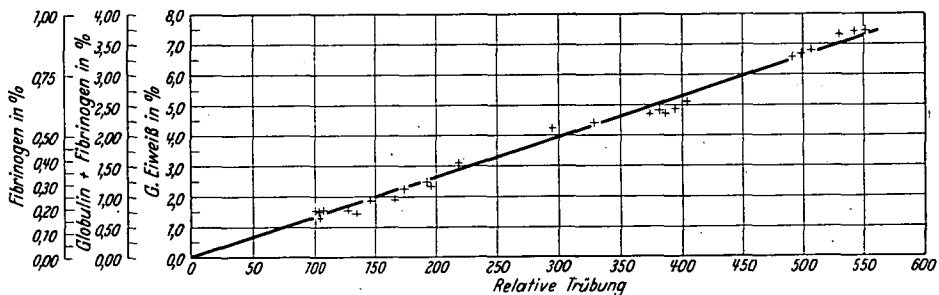


Abb. 30.

#### Nötige Lösungen:

1. Mit Ammoniumsulfat halbgesättigte 0,1 n-Salzsäurelösung (500 ccm konz. Ammoniumsulfatlösung + 500 ccm 0,2 n-Salzsäurelösung).
2. Halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung (500 ccm konz. Ammonsulfatlösung + 500 ccm destilliertes Wasser).
3. Eine zu 27% gesättigte Ammonsulfatlösung (27 ccm konz. Ammonsulfatlösung + 73 ccm destilliertes Wasser).

Wie aus unserem Kurvenbild ersichtlich, beträgt die Differenz der in 28 Fällen vorgenommenen Bestimmungen maximal 10%.

Im folgenden wollen wir den Gang des Verfahrens und der Berechnung an einem Beispiel ausführlich schildern:

In einer Spritze von 10 ccm Inhalt wurden zu 2 ccm isotonischer Natriumcitratlösung aus der Vene 8 ccm Blut aufgesaugt, gut vermischt, zentrifugiert; 1 ccm des Plasmas wurde mit physiologischer Natriumchloridlösung auf das Zehnfache verdünnt. Rusznyák hat zur Bestimmung der einzelnen Eiweißfraktionen je 0,1 ccm Plasma verwendet. Wir fanden es

zweckmäßiger, je 1 *ccm* Plasma nach obigen Angaben zu verdünnen. Von dieser Lösung maßen wir 1,0 *ccm* in einen Erlenmeyerkolben ab und fügten 50 *ccm* einer mit 0,1 n-Salzsäure halbgesättigten Ammoniumsulfatlösung zu (Lösung Nr. 1). Mit dieser Lösung wurde die Küvette von 2,5 *mm* Durchmesser gefüllt. Die Ablesungen am Nephelometer begannen nach  $\frac{1}{2}$  Minute. Der Mittelwert der 10 Ablesungen war 26,6, die dementsprechende relative Trübung (R), wie aus der zugehörigen Tabelle abzulesen, oder nach der Formel

$$R = \frac{100}{A} \cdot 100$$

zu berechnen ist (wo A = den am Nephelometer abgelesenen Wert bedeutet), beträgt 375. Diesem Trübungsgrad entspricht nach unseren Untersuchungen (s. Abb.) ein Eiweißwert von 4,9%. Da wir Citratplasma verwendet haben, muß zu diesen 4,9% noch ein Viertel addiert werden, um den Gesamteiweißwert des Nativplasmas, 6,12%, zu gewinnen.

Zur Globulinbestimmung wird ebenfalls 1 *ccm* verdünnten Plasmas in einen Erlenmeyerkolben pipettiert und mit 25 *ccm* einer halbgesättigten Ammoniumsulfatlösung (Lösung Nr. 2) versetzt. Als Mittelwert der auf gleiche Weise vorgenommenen Ablesungen bekamen wir 57; aus der Tabelle dementsprechend abgelesene Trübung ergibt 175, der dazugehörige Wert für Globulin + Fibrinogen beträgt 1,12%. Da durch die halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung zusammen mit den Globulinen gleichzeitig auch das Fibrinogen ausgefällt wird, kann der Globulinwert erst nach der Fibrinogenbestimmung berechnet werden. Der erhaltene Fibrinogenwert muß von dem obigen Wert für Globulin + Fibrinogen abgezogen werden.

Zur Fibrinogenbestimmung werden zu 0,4 *ccm* unverdünnten Plasmas 25 *ccm* der oben angegebenen Ammoniumsulfatlösung (Lösung Nr. 3) zugegeben. Ergebnisse der auf gleiche Weise vorgenommenen Ablesungen: Mittelwert 91, relative Trübung 110, das Fibrinogen, aus der Abbildung abgelesen, 0,17%. Wird diese Zahl von dem oben erhaltenen Wert für Globulin + Fibrinogen (1,12) subtrahiert, bekommen wir den Globulingehalt des untersuchten Plasmas, also 0,95%. Natürlich müssen auch zu dem Globulin und Fibrinogen 25% der erhaltenen Werte addiert werden, um die Eiweißwerte des Nativplasmas: Globulin 1,18% und Fibrinogen 0,22%, zu erhalten.

Nach dem bisher Gesagten war also die Zusammensetzung des untersuchten Plasmas wie folgt:

Fibrinogen . . .	0,22%
Globulin . . .	1,18%
Albumin . . .	4,72%
Gesamteiweiß . .	<u>6,12%</u>

Das Albumin erhalten wir durch Subtraktion der Werte für Globulin und Fibrinogen von dem Gesamteiweißgehalt.

Die Bestimmung der drei Eiweißfraktionen mit Hilfe dieses nephelometrischen Verfahrens kann in 10–15 Minuten durchgeführt werden, während die chemische Bestimmung nach Howe 4–5 Stunden in Anspruch nimmt. Wir glauben also das nephelometrische Verfahren sowohl für klinische als auch für experimentelle Reihenuntersuchungen innerhalb der angegebenen Fehlerbreite empfehlen zu dürfen.

---